

de19935268/pn

L3 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD
ACCESSION NUMBER: 2001-161182 [17] WPINDEX
DOC. NO. CPI: C2001-048228
TITLE: New N-acetyl amino acid racemase enzyme derived from
Amycolatopsis orientalis ssp. lurida, useful for
producing enantiomerically enriched amino acids.
DERWENT CLASS: B04 D16
INVENTOR(S): BOMMARIUS, A; DRAUZ, K; KULA, M; VERSECK, S
PATENT ASSIGNEE(S): (DEGS) DEGUSSA-HUELS AG
COUNTRY COUNT: 26
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN	IPC
EP 1074628	A1	20010207	(200117)*	GE	23	C12N015-61	
R: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI							
DE 19935268	A1	20010208	(200117)			C12N009-90	<--
JP 2001046088	A	20010220	(200126)		16	C12N015-09	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
EP 1074628	A1	EP 2000-115902	20000725
DE 19935268	A1	DE 1999-19935268	19990727
JP 2001046088	A	JP 2000-222928	20000724

PRIORITY APPLN. INFO: DE 1999-19935268 19990727

INT. PATENT CLASSIF.:

MAIN: C12N009-90; C12N015-09; C12N015-61
SECONDARY: C12N001-21; C12N015-63; C12N015-80; C12P013-04;
C12P041-00; C12Q001-68
INDEX: C12P041-00, C12R001:01; C12R001:04; C12R001:04;
C12R001:04; C12R001:04; C12P013-04; C12N015-09;
C12N009-90; C12N001-21

BASIC ABSTRACT:

EP 1074628 A UPAB: 20010328

NOVELTY - An N-acetyl amino acid racemase (AAR) enzyme (I) derived from
Amycolatopsis orientalis ssp. lurida (DSM 43134) is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the
following:

- (1) a gene coding for (I);
- (2) a vector containing the gene;
- (3) a microorganism containing the gene;
- (4) a primer for the gene; and
- (5) a probe for the gene.

USE - (I) is useful for producing enantiomerically enriched amino
acids in an enzyme-membrane reactor (claimed), e.g. by AAR-catalyzed
conversion of N-acetyl-D-methionine to N-acetyl-L-methionine followed by
acylase-catalyzed conversion to L-methionine.

ADVANTAGE - (I) exhibits reduced heavy metal dependency compared with
the AAR of Amycolatopsis sp. TS-1-60 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 42,
853, 1995).

Dwg.0/8

FILE SEGMENT: CPI

FIELD AVAILABILITY:
MANUAL CODES:

AB; DCN

CPI: B04-E03E; B04-E05; B04-E08; B04-F0100E; B04-N03;
B11-A02; D05-A01A; D05-A01B5; D05-C03F; D05-H12A;
D05-H12B2; D05-H12D1; D05-H12E; D05-H14A; D05-H17A3;
D05-H18



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 35 268 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/90
C 12 N 15/61
C 12 N 15/63
C 12 Q 1/68

⑲ Aktenzeichen: 199 35 268.2
⑳ Anmeldetag: 27. 7. 1999
㉔ Offenlegungstag: 8. 2. 2001

DE 199 35 268 A 1

⑦1 Anmelder:
Degussa-Hüls AG, 60311 Frankfurt, DE

⑦2 Erfinder:
Verseck, Stefan, Dr., 52074 Aachen, DE; Kula,
Maria-Regina, Prof., 52382 Niederzier, DE;
Bommarius, Andreas, Dr., Atlanta, Ga., US; Drauz,
Karlheinz, Prof., 63579 Freigericht, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 N-Acetylaminosäureracemase

⑤7 Die vorliegende Erfindung richtet sich auf eine N-Acetylaminosäureracemase (AAR) sowie das diese codierende Gen. Außerdem werden die dieses Gen enthaltenden Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen geschützt. Die AAR des Standes der Technik hat eine hoch schwermetallionenabhängige Aktivität. Dieses Merkmal ist bei der vorliegenden AAR vermindert. Verwendung der AAR zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren und Derivaten davon.

DE 199 35 268 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung richtet sich auf eine N-Acetylaminosäureracemase (AAR) aus *Amycolatopsis orientalis* subspecies *lurida* sowie das dafür codierende Gen und das Gen enthaltende Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen.

Mittels N-Acetylaminosäureracemasen können im Zusammenwirken mit Acylasen optisch reine Aminosäuren zu 100% aus den entsprechenden geschützten racemischen N-Acetylaminosäuren gewonnen werden. Optisch reine Aminosäuren werden in der parenteralen Ernährung sowie zur Herstellung chiraler bioaktiver Wirkstoffe gebraucht.

Aus *Streptomyces atratus* Y-53 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40, 835-840) und *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a, 42, 853-859) sind bereits N-Acetylaminosäureracemasen (AAR) bekannt.

Die AAR aus *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 besitzt bzgl. ihrer Aktivität eine starke Kobalt- und Manganionenabhängigkeit. Die Zugabe dieser Schwermetallionen zur Synthesebrühe ist im großtechnischen Maßstab aus Sicht des Umweltschutzes nachteilig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, eine weitere AAR zur Verfügung zu stellen, welche darüber hinaus eine geringere Aktivitätsabhängigkeit von Schwermetallionen aufweist, verglichen mit der AAR aus TS-1-60.

Gelöst wird diese Aufgabe durch eine AAR gemäß Anspruch 1. Anspruch 2 schützt die für dieses Enzym codierenden Gene. Anspruch 3 bis 5 betrifft Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen, die diese Gene enthalten. Anspruch 6 ist auf Primer für dieses Gen gerichtet. Anspruch 7 schützt vorteilhafte Gensonden zum Aufspüren des AAR-Gens. Ansprüche 8 und 9 sind auf vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen AAR gerichtet.

Dadurch, daß man die N-Acetylaminosäureracemase (Seq. 2) aus *Amycolatopsis orientalis* subspecies *lurida* zur Racemisierung von N-Acetylaminosäuren bereitstellt, erhält man ein Enzym, welches ausschließlich N-Acetylaminosäuren racemisiert, N-ungeschützte Aminosäuren nicht umsetzt und darüber hinaus gegenüber der AAR aus TS-1-60 eine geringere Abhängigkeit für das Schwermetallion Co^{2+} aufweist. Diese Tatsache ist für den großtechnischen Einsatz des Enzyms allerdings aus Kosten- und Umweltgesichtspunkten äußerst vorteilhaft. Die Identität auf DNA-Ebene von A. sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995b, 42, 884-889) und A. *orientalis* subsp. *lurida* bzgl. des Gens, welches für die Racemase codiert, beträgt 86%. Es war mithin sehr überraschend, in einer Gattung von Mikroorganismen gleiche Enzyme mit derart verschiedenen Eigenschaften zu finden.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden Gene (Seq. 1) codierend für die erfindungsgemäße Racemase beansprucht. Hierbei sind erfindungsgemäß auch die Gene umfaßt, welche im Rahmen der Bandbreite, die durch die Degeneration des genetischen Codes vorgegeben wird, möglich erscheinen.

Weiterhin sind im Rahmen der Erfindung auch Plasmide oder Vektoren geschützt, welche die erfindungsgemäßen Gene aufweisen. Als bevorzugte Plasmide und Vektoren sind anzusehen pAAR1-2II, pAAR2-2II und pAAR3-2II (Fig. 1, 3 u. 4).

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung sind alle Mikroorganismen, die die erfindungsgemäßen Gene aufweisen, beansprucht. Insbesondere sind dies Mikroorganismen wie die Plasmid tragenden E. coli-Stämme (DH5 α bzw. BL21). Ganz besonders bevorzugt ist der Stamm DE3 in diesem Zusammenhang.

Prinzipiell kommt für die Durchführung der Erfindung jedes dem Fachmann bekannte Plasmid (Vector)/Wirts-System in Frage, in welches das Gen über eine entsprechende Schnittstelle kloniert bzw. das so entstandene Konstrukt transformiert werden kann. Dem Fachmann sind derartige Systeme geläufig, und er weiß um die Möglichkeit, daß Plasmide mit verschiedenen Wirts-Systemen kombiniert werden können. Eine Übersicht über das T7-Expressionssystem ist in Studier et al., Methods Enzymol. 1990, 185, 61-69 gegeben. Weitere geeignete Expressionssysteme können in den einschlägig bekannten Prospekten der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech sowie Gibco BRL gefunden werden.

Das Ableiten geeigneter Primer geschieht durch den Vergleich von schon bekannten DNA-Sequenzen des gesuchten Gens, oder durch das "Übersetzen" von Aminosäure-Sequenzen in die Kodon-Verwendung des entsprechenden Organismus (zum Beispiel für Streptomycceten: Wright et al., Gene 1992, 113, 55-65). Auch übereinstimmende AS-Sequenzen von Proteinen aus sogenannten Superfamilien sind dabei hilfreich (Firestone et al., Chemistry & Biology 1996, 3, 779-783).

Die hier erwähnte AAR gehört dabei der Enolase-Superfamilie an (Babbitt et al., Biochemistry 1996, 35, 16589-16501). Es sind dem Fachmann deshalb bevorzugt Strategien bekannt, die zu Primern führen, welche für den erfindungsgemäßen Zweck als vorteilhaft erscheinende Sequenz herangezogen werden können. Insbesondere können für die erfolgreiche PCR-vermittelte Amplifikation eines Genabschnitts zwei Primer (AR1) und (AR5) konstruiert werden.

AR1: 5' ATG AAA CTG AGC GGC GTG GAA CTG CGG CGA 3' (Seq. 4)

AR5: 5' CCA GCC GGG TTC GAT CTT GAG CTT GAT GCG 3' (Seq. 5)

Weiterhin sind als bevorzugte Primer die schnittstellenträgenden Anfangs- bzw. Endsequenzen des erfindungsgemäßen Gens anzusehen. Geeignete Schnittstellen sind in den oben angesprochenen Prospekten zu finden.

Ganz besonders bevorzugt sind die folgenden Sequenzen, welche die NdeI bzw. BglII-Schnittstelle aufweisen:

AR_EX1Nde: 5'CAA GGA GCA CAT ATG AAA CTC AGC GGT GTG G3'
(Seq. 6)

AR_Ex2Bgl: 5'GAA TTC GTA AGA TCT TAC GAA CCG ATC CAC G3'
(Seq. 7)

Mit den zwei Primern AR1 und AR5 wurde ein 504 bp großes Fragment des erfindungsgemäßen Gens mittels PCR-Technik amplifiziert. Diese Technik ist ausführlich in Saiki et al., Science (1988), 239, 487-491 gewürdigt und dem Fachmann daher bekannt. Seine Abfolge an Basenpaaren (Seq. 3) ist wie unten dargestellt:

5'ATGAAACTGAGCGGCGTGGAACTGCGGCGAGTCCGGATGCCGCTCGTGGCCCCGTTTC
CGGACGTCGTTCGGGACGCAGTCCGAGCGGGAATTGCTGCTGGTCCGCGCGGTGACCCC
GGCGGGCGAGGGCTGGGGCGAATGTGTGCGGATGGAGGCGCCGCTCTACTCGTCGGAGT
ACAACGACGCCGCCGAGCACGTGCTGCGGAACCATCTGATCCCCGCACTGCTGGCGGCC
GAGGACGTGACCGCGCACAAAGGTGACGCCGTTGCTGGCGAAGTTCAAGGGCCACCGGAT
GGCGAAGGGCGCGCTGGAGATGGCGGTCTCTCGACGCCGAACTCCGCGCGCATGACCGGT
CCTTCGCGGCCGAGCTGGGGTCCACTCGCGACTCCGTGGCCTGCGGGGTCTCGGTGGG
ATCATGGACTCGATCCCGCACCTGCTCGACGTCGTCGGCGGCTACCTCGACGAGGGCTA
CGTCCGCATCAAGCTCAAGATCGAACCCGGCTGG3'

Es diente als Teil einer Sonde zum Auffinden des beanspruchten Gens. Die Herstellung einer Gensonde aus einem Genfragment ist u. a. in Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) dargestellt und dem Fachmann geläufig. In diesem speziellen Fall wurde das o. a. Genfragment zusammen mit der DIG-Markierung der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen Racemase in einem Prozeß zur Herstellung von optisch angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten. Dazu wird die racemische N-Acetylaminosäure in Gegenwart einer Acylase und der AAR unter physiologischen Bedingungen zur Reaktion gebracht. Dadurch, daß die gebildete Aminosäure dabei durch Ausfällung aus dem Gleichgewicht der Reaktion entfernt wird und die AAR aus der verbleibenden optisch angereicherten N-Acetylaminosäure immer das Racemat bildet, kommt es zur 100%igen Umsetzung des Racemats zu einer optischen Antipode der betreffenden Aminosäure.

Vorzugsweise erfolgt dieser Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor (DE 199 10 691.6).

Mit Hilfe der oben dargestellten Sonde wurde über Southern-Hybridisierung (Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985)) ein ca. 2,5 kb EcoRI Fragment aus genomischer DNA von *A. orientalis* subspecies *lurida* detektiert.

Es folgte eine Shot-gun Klonierung, in der die gesamte DNA-Population von 2,5 kb großen EcoRI Fragmenten der genomischen DNA in die zuvor mit dem Restriktionsenzym EcoRI hydrolysierten Plasmide pUC18 (Vieira et al., Gene (1982), 19, 259-268) ligiert wurden.

Die so entstandenen Vektoren wurden dann in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Identifikation des DNA-Fragmentes mit dem Gen der AAR erfolgte dann mittels Kolonie-Hybridisierung (Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985)) unter Verwendung der zuvor beschriebenen DIG-markierten 504 bp-Sonde.

Das erhaltene Plasmid mit dem AAR-Gen wurde pAAR1-21I (Fig. 1) genannt. Fig. 2 zeigt die Restriktionskarte des 2,5 kb EcoRI Fragmentes mit dem AAR-Gen. Das 1,3 kb-EcoRI Fragment mit dem AAR-Gen wurde doppelsträngig sequenziert und analysiert.

Für die Amplifikation des Gesamtgens mittels PCR aus pAAR1-21I wurden die Primer AR_Ex1Nde und AR_Ex2Bgl eingesetzt. Mit Hilfe dieser Primer wurde am 5'-Ende des Gens eine NdeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt und am 3'-Ende des AAR-Gens eine BglII-Schnittstelle.

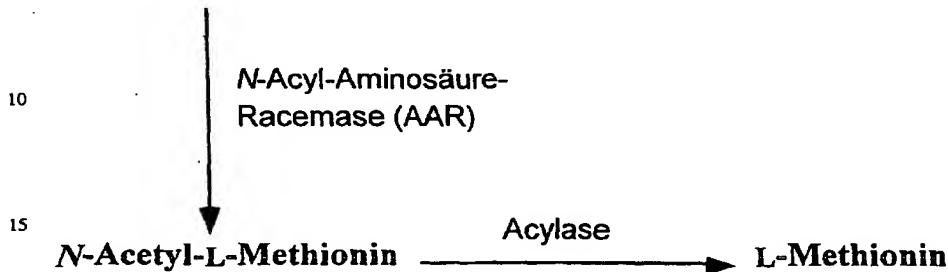
Das Amplifikat wurde blunt-end in mit SmaI hydrolysiertem Plasmid pUC18 ligiert und das so entstandene Konstrukt pAAR2-21I (Fig. 3) in *E. coli* DH5 α transformiert.

Das Einfügen dieser Restriktionsschnittstellen NdeI und BglII ermöglichte die Klonierung des Gens in den Expressionsvektor pET11a (Firma Novagen). Dieser Expressionsvektor, pAAR3-21I (Fig. 4) genannt, mit dem AAR-Gen aus *A. orientalis* subspecies *lurida* wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) (Firma Novagen; enthält T7-Polymerase unter der Kontrolle des lac-Operons im Genom integriert) transformiert.

Mittels des Expressionsplasmides pAAR3-21I konnte die AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3) nach einem abgewandeltem Protokoll von Studier et al., Methods Enzymol (1990), 185, 61-89 heterolog überexprimiert werden. Die Überexpression wurde durch Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Der *E. coli* Expressionsstamm besaß ursprünglich keine N-Acetylaminosäureracemase-Aktivität.

Die AAR-Aktivität wurde in einem gekoppeltem enzymatischen Assay (Abb. 1) verfolgt, indem die Bildung einer deacetylierten Aminosäure aus einer N-Acetyl-D-Aminosäure, hier Methionin, mit dem HPLC-System I nachgewiesen wurde. Als Hilfsenzyme dienten die L-spezifischen Acylasen aus Schweinenieren oder *Aspergillus oryzae*.

Schematische Darstellung des Enzymassays

5 **N-Acetyl-D-Methionin**

Die Aufreinigung der heterolog überexprimierten AAR erfolgte nach Zellaufschluß über 3 Schritte:

1. Hitzefällung bei 50°C für 30 min.
2. Anionen-Austauschchromatographie über Q-Sepharose (fast flow; Firma Pharmacia)
3. Hydrophobe-Interaktionschromatographie über Phenyl-Sepharose (stream line; Firma Pharmacia)

Weitere Charakterisierungen der AAR erfolgten mit dem HPLC-System II. Mit diesem Systems konnte die Aktivität der AAR direkt untersucht werden. Auf das Hilfsenzym, die Acylase, konnte so verzichtet werden, so daß störende Nebenaktivitäten vermieden werden konnten.

Als Eigenschaften der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* haben sich folgende herauskristallisiert:

- i) Die AAR racemisiert ausschließlich N-Acetylaminosäuren, N-Acetyl-ungeschützte Aminosäuren werden nicht umgesetzt.
 - ii) Die überexprimierte Proteinbande der AAR erscheint in der SDS-PAGE-Analyse (Laemmli, Nature (1970), 227, 680-685), im denaturierten Zustand, bei einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa.
 - iii) Die AAR besitzt ein pH-Optimum bei pH 8 (Fig. 5).
 - iv) Die spezifische AAR-Aktivität nach Aufreinigung betrug 30,6 U/mg mit 2 mM $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay. Dieser Wert liegt damit ca. 30,8% höher als der bei Tokuyama und Hatano (Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44, 774-777) für deren Racemase gefundene.
 - v) Die Aktivität mit 10 mM $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay betrug 37,5 U/mg.
 - vi) Die Steigerung der Aktivität der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* mit 1 mM $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ gegenüber der Aktivität ohne Metallion im Assay betrug 1250%. Die Gabe von 1 mM $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay bewirkte bei der AAR aus *A. sp.*, TS-1-60 eine Steigerung von nur 496% (Tokuyama und Hatano, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44, 774-777).
- Daraus ergibt sich, daß die AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* bei gleicher $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration im Assay um 152% aktiver ist, als die Racemase aus *A. sp.* TS-1-60.
- vii) Weitere zweiwertige Ionen, wie $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ wurden in verschiedenen Konzentrationen im Standardenzymassay getestet. Dabei zeigten Mn und Mg noch ca. 40% der Aktivität, bei 10 mM, im Vergleich zur Kobaltsubstitution (Fig. 6).
 - viii) Eine Substrat-Inhibierung tritt bei der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* bei Substratkonzentrationen von N-Acetyl-D-methionin größer 200 mM auf (Fig. 7). Für die TS-1-60 wurde eine Inhibierung schon bei 50 mM N-Acetyl-D-methionin beobachtet.

Es läßt sich festhalten, daß die vorliegende Racemase gegenüber der aus dem Stand der Technik genannten deutliche Vorteile im Hinblick auf Aktivität, Schwermetallionenabhängigkeit und Inhibierungstendenz für den Einsatz im industriellen Maßstab bereithält.

Der Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* ist unter der Nummer DSM43134 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt.

Unter AAR wird im Rahmen der Erfindung sowohl das native wie auch das rekombinant hergestellte Enzym verstanden.

Beispiele

1. Anzucht des Actinomyceten-Stamms *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* und Präparation der genomischen DNA

Der Actinomyceten-Stamm *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* (DSM43134) wuchs auf TSB-Medium (Oxoid, Wesel) an. Die Kultur wurde nach der Ernte zweimal mit steriler 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte nach MEHLING et al., FEMS Microbiol Lett (1995), 128, 119-126.

2. Oligonucleotide

Tabelle 1

Liste der verwendeten Oligonucleotide

Bezeichnung:	Verwendung:	Sequenz:
AR1	PCR	5' (AG)TG AA(AG) CT(GC) AG(GC) GG(GCT) GT(GC) GA(AG) CT(GC) CG(GC) CGA 3'
AR5	PCR	5' CCA (GC)CC (GC)GG (GCT)TC GAT CTT (GC)AG CTT GAT (GC)CG 3'
AR_Ex1Nde	PCR	5' CAA GGA GCA CAT ATG AAA CTC AGC GGT GTG G 3'
AR_Ex2Bgl	PCR	5' GAA TTC GTA AGA TCT TAC GAA CCG ATC CAC G 3

3. Gentechnische Methoden

Alle hier verwendeten gentechnischen Methoden sind, wenn nicht anders vermerkt, beschrieben von Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985). Alle Enzyme und entsprechende Puffer wurden nach Angaben der Hersteller benutzt. Für die automatische Sequenzierung mit dem ALFred DNA-Sequencer (Pharmacia, Freiburg) wurden Cy5 markierte Primer benutzt. Der Southern-Blot und die Hybridisierung, sowie das 3'-DIG-Labeling (für nicht-radioaktiven Nachweis) der DNA-Sonden erfolgten nach Angaben der Firma Roche Diagnostics.

4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Amplifikationen mittels der Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Biometra Thermocycler (Göttingen) in Anlehnung an Saiki et al., Science (1988), 239, 487-491 durchgeführt. Als Template diente genomische DNA aus *A. orientalis subspecies lurida*. Es wurde die thermostabilen DNA-Polymerase Taq (Firma Gibco BRL) in den PCR-Ansätzen eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Die Annealing-Temperatur A wurden über die DNA-Schmelztemperatur (T_m) der Oligonucleotide ermittelt. Die Zeit X für die Kettenreaktion der DNA-Polymerase richtete sich nach der 1 kb = 1 min-Regel. Alle Ansätze wurden mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet.

DE 199 35 268 A 1

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

5	Polymerase-Puffer (10 x 5 µl)
	dNTP's je 10 nmol
10	Primer je 50 pmol
	DMSO 10%
15	DNA-Polymerase 1 U
20	chromosomale DANN 10 - 100 ng
25	Auffüllen mit H ₂ O auf 50 µl
30	(MgCl ₂ nach Angaben des Herstellers der Polymerase)

Amplifikationsprogramm

35	Schritt 1	98°C	5 min
	2	95°C	1 min
40	3	A°C	45 sec
45	4	72°C	Xmin
50	5	72°C	2 min

Zugabe der DNA-Polymerase bei Schritt 2, die Schritte 2-4 wurden 30 mal durchlaufen.

55

60

65

Tabelle 2

Auflistung der für die PCR verwendeten Primerpaare (vgl. Tab. 1), Annealing-Temperaturen, sowie die Länge der Amplifikate

Primer-Paar:	Annealing-Temperatur (T_m):	Länge der zu amplifizierenden DNA:
AR1/AR5	73,8 °C	1,1 kb
AR_Ex1Nde/AR_Ex2Bgl	69,0 °C	1,1 kb

5. Hybridisierung nach Southern und Koloniehybridisierung

Für die Hybridisierung nach Southern wurden Aliquots von Präparationen der genomischen DNA von *A. orientalis* subspecies *lurida* mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* hydrolysiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden dann über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Die so aufgetrennten Fragmente wurden anschließend auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Firma Amersham) geblotet. Als Sonde wurde das DIG-markierte (Firma Roche Diagnostics) 504 bp-Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida* eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 61°C.

Das Signal gebende 2,5 kb große DNA-Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida* wurde eluiert, mit dem *EcoRI* hydrolysiertem Plasmid pUC18 ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 α Shot-gun kloniert.

Die durch die Shot-gun Klonierung gewonnenen *E. coli* Transformanten wurden zu je 50 auf LB_{amp100}-Platten ausgestrichen. Mit diesen Platten wurde dann ein Colonie-Lift und anschließend eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Als Sonde diente wiederum das DIG-markierte 504 bp Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida*. Mit dieser Methode konnte eindeutig eine *E. coli* Transformante mit dem AAR-Gen identifiziert werden. Das Plasmid wurde pAAR1-21I genannt.

Diese Techniken sind ausführlich in Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985) gewürdigt und dem Fachmann daher bekannt.

6. Heterologe Expression des AAR-Enzyms aus *A. orientalis* subsp. *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3)

Die standardisierte heterologe Expression des rekombinanten AAR-Enzyms aus *A. orientalis* subsp. *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte in Anlehnung an Studier et al., Methods Enzymol (1990), 185, 61–89:

Mit Plasmiden zur Überexpression (pAAR3-21I) transformierte *E. coli* BL21(DE3)-Derivate wurden in LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert. Es wurden dann 500 ml Hauptkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in 4 Schikane-Kolben) mit 10 ml Übernachtskultur (1 : 50) beimpft. Die T7-Polymerase wurde bei einer Zelldichte von OD_{600 nm} = 0,5–0,9 mit 5 ml einer 100 mM IPTG-Lösung (Konzentration im Kolben 1 mM; IPTG = Isopropylthiogalactosid) induziert. Nach weiteren 4–6 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet.

In Rohextrakten der Expressionsklone, die in oben beschriebener Weise angezogen wurden, konnte eine AAR-Aktivität von 0,6–1,2 U/mg Gesamtprotein ermittelt werden.

7. Nachweis der Racemaseaktivität des rekombinanten AAR-Enzyms

Rohextrakte der Überexpressionsklone bzw. gereinigte Enzymfraktionen wurden in einem Enzymtest eingesetzt, indem die Bildung von L-Methionin aus N-Acetyl-D-Methionin (s. Abb. 1) über HPLC nachgewiesen werden konnte:

Der Standard-Enzymtest (abgewandelt nach Tokuyama et al., Appl Microbiol Biotechnol (1994), 40, 835–840; ibid, Appl Microbiol Biotechnol (1995a), 42, 853–859) setzte sich wie folgt zusammen:

Lösungsmittel: Tris/HCl, pH 7,5 50 mM

N-Acetyl-D-Methionin 25 mM

Cobaltchlorid 2 mM

Acylase I (ASch o. AAsp) 1 U

Protein 2–150 µg aufgereinigtes Protein o. Gesamtprotein Endvolumen 200 µl

Acylase I und Co²⁺ liegen dabei im Überschuß vor, so daß die AAR-Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Inkubation erfolgte 10–40 min bei 30°C. Die Reaktion wurde dann durch 3minütiges Kochen gestoppt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC (System I).

Wenn nicht anders erwähnt, wurde Acylase I aus Schweineinnereien (ASch) im Enzymtest eingesetzt und als Ion Co²⁺ (CoCl₂ × 6H₂O). Alternativ wurde aber auch Acylase I aus *Aspergillus oryzae* (AAsp) verwendet.

In Assays, welche über HPLC-System II analysiert wurden, konnte die Acylase weggelassen werden, da mit diesem System N-Acetylaminosäuren direkt enantioselektiv getrennt und nachgewiesen werden konnten.

Außer Co²⁺ (CoCl₂ × 6H₂O) wurden auch andere zweiwertige Ionen, wie MnCl₂ × 4H₂O, zu SO₄ × 7H₂O und MgCl₂ ×

DE 199 35 268 A 1

6H₂O in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (0,1–10 mM).

Die Substratinhibition wurde getestet, indem die Aktivität der AAR mit 25 bis 400 mM N-Acetyl-D-methionin als Substrat versetzt wurde.

8. HPLC-Analyse

System I

Säule: RP C18, 5 µm, 250 × 4,6 mm, Chromasil®

Laufmittel A: 23 mM Natriumacetat, 10% Acetonitril, pH 6,0

Laufmittel B: 100% Acetonitril

Flußrate: 1 ml/min

Probenvolumen: 20 µl

Detektion: UV-VIS 225 nm

Fluoreszenz: 340/440 nm

Derivatisierung: auf Basis o-Phthaldialdehyd

(OPA)/N-Isobutyryl-L-Cystein (IBLC) nach Brückner et al., Journal of Chromatography A (1994), 666, 259–273.

Gradient

Zeit	Gemisch
0 min	0% B
20 min	24% B
22 min	100% B
23 min	100% B
25 min	0% B
35 min	0% B

System II

Säule: ENAN 1, Merget, 145 × 4,6 mm, (Dr. K. Günther, Degussa-Hüls AG, persönliche Leihgabe)

Laufmittel A: 700 ml Methanol, 300 ml Ammoniumacetat (0,01 M), 0,5 ml Eisessig

Flußrate: 1 ml/min

Probenvolumen: 20 µl

Detektion: UV-VIS 225 nm

Gradient: isokratisch

9. Aufreinigung der AAR aus *A. orientalis subspecies lurida*

Die Aufreinigung der heterolog überexprimierten AAR erfolgte nach Zellaufschluß über 3 Schritte:

1. Zellaufschluß: 30%ige Zellsuspension mit Tris/HCl (pH 7,5) und das 1,5fache an Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) wurden vermengt und im Disintegrator S (für 2 mal 15 min) aufgeschlossen.

2. Hitzefällung bei 50°C für 30 min.

3. Anionen-Austauschchromatographie über Q-Sepharose (fast flow; Firma Pharmacia), Elution bei ca. 25% Laufmittel B.

4. Hydrophobe-Interaktionschromatographie über Phenyl-Sepharose (stream line; Firma Pharmacia), Elution bei ca. 40% Laufmittel B.

Die Elution erfolgte jeweils mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Laufmittel A) über einen linearen Gradienten mit 0,5 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Laufmittel B).

DE 199 35 268 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Huels Aktiengesellschaft

<120> N-Acetylaminosäureracemase

5

<130> 990095 AM

<140>

<141>

10

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1107

<212> DNA

<213> Amycolatopsis orientalis

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1107)

25

<400> 1

gtg aaa ctc agc ggt gtg gaa ctg cgc cgg gtc cgg atg ccg ctc gtg 48
Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
1 5 10 15

30

gcc ccg ttc cgg acg tcg ttc ggg acg cag tcc gag cgg gaa ttg ctg 96
Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
20 25 30

ctg gtc cgc gcg gtg acc ccg gcg ggc gag ggc tgg ggc gaa tgt gtc 144
Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
35 40 45

35

gcg atg gag gcg ccg ctc tac tcg tcg gag tac aac gac gcc gcc gag 192
Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
50 55 60

40

cac gtg ctg cgg aac cat ctg atc ccc gca ctg ctg gcg gcc gag gac 240
His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80

45

gtg acc gcg cac aag gtg acg ccg ttg ctg gcg aag ttc aag ggc cac 288
Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
85 90 95

50

cgg atg gcg aag ggc gcg ctg gag atg gcg gtc ctc gac gcc gaa ctc 336
Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
100 105 110

55

cgc gcg cat gac cgg tcc ttc gcg gcc gag ctg ggg tcc act cgc gac 384
Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
115 120 125

60

tcc gtg gcc tgc ggg gtc tcg gtc ggg atc atg gac tcg atc ccg cac 432
Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His

65

DE 199 35 268 A 1

	130	135	140	
5	ctg ctc gac gtc gtc ggc ggc tac ctc gac gag ggc tac gtc cgg atc Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile 145 150 155 160			480
10	aag ctg aag atc gag ccc ggc tgg gac gtc gag ccg gtc cgg cag gtg Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val 165 170 175			528
15	cgt gag cgc ttc ggt gac gac gtg ctg ctg cag gtc gac gcg aac acc Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr 180 185 190			576
20	gcg tac acg ctg ggc gac gcg ccc ctg ctg tcc cgg ctc gac ccg ttc Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe 195 200 205			624
25	gac ctg ctg ctg atc gag cag ccg ctc gaa gaa gag gac gtg ctc ggc Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly 210 215 220			672
30	cac gcc gag ctg gcc aag cgg atc cgg acg ccg atc tgc ctc gac gag His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu 225 230 235 240			720
35	tcg atc gtc tgc gcc aag gcc gcc gcg gac gcg atc aag ctc ggc gcc Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala 245 250 255			768
40	tgc cag atc gtc aac atc aaa ccg ggc cgg gtc ggc gga tac ctc gaa Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu 260 265 270			816
45	gcc cgc cgg gtg cac gac gtc tgc gcg gca cac ggg atc gcg gtg tgg Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp 275 280 285			864
50	tgc ggc ggg atg atc gag acc ggg ctc ggc cgg gcg gcc aac gtc gca Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala 290 295 300			912
55	ctg gcc tgc ctg ccc ggc ttc acg ctg ccg ggg gac acc tgc gcg tcc Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser 305 310 315 320			960
60	ggc cgg ttc tat cgc acc gac atc acc gag ccg ttc gtg ctg gac gcc Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala 325 330 335			1008
65	ggg cat ctg ccg gtg ccg acc ggg ccg ggc ctc ggg gtg act ccg att Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile 340 345 350			1056
	ccg gat ctt ctg gac gag gtc acc acg gag aaa gcg tgg atc ggt tgc Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser 355 360 365			1104
	tag			1107

DE 199 35 268 A 1

<210> 2
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis orientalis 5

 <400> 2
 Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
 1 5 10 15 10
 Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
 35 40 45 15
 Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
 50 55 60 20
 His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
 85 90 95 25
 Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
 115 120 125 30
 Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His
 130 135 140 35
 Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val
 165 170 175 40
 Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr
 180 185 190 45
 Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe
 195 200 205
 Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly
 210 215 220 50
 His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala
 245 250 255 55
 Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu
 260 265 270 60

65

DE 199 35 268 A 1

Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp
 275 280 285

5 Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala
 290 295 300

Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser
 305 310 315 320

10 Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala
 325 330 335

15 Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile
 340 345 350

Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly
 355 360 365

20 Ser

<210> 3
 25 <211> 504
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Gensonde

<400> 3
 atgaaactga gggcggtgga actgcggcga gtccggatgc cgctcgtggc cccgttccgg 60
 35 acgtcgttcg ggacgcagtc cgagcgggaa ttgctgctgg tccgcgcggt gaccccgcg 120
 ggcgagggct ggggcgaatg tgcgcgatg gaggcgccgc tctactcgtc ggagtacaac 180
 40 gacgccgccc agcacgtgct gcggaaccat ctgatccccg cactgctggc ggccgaggac 240
 gtgaccgcgc acaaggtgac gccgttgctg gcgaagttca agggccaccg gatggcgaag 300
 ggcgcgctgg agatggcggc ctcgcacgcc gaactccgcg cgcattgaccg gtccttcgcg 360
 45 gccgagctgg ggtccactcg cgactccgtg gcctgcgggg tctcggtcgg gatcatggac 420
 tcgatccccg acctgctcga cgtcgtcggc ggctacctcg acgagggcta cgtccgcac 480
 50 aagctcaaga tcgaaccgg ctgg 504

<210> 4
 55 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 60 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

65

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer AR1
 5
 <400> 4
 atgaaactga gcggcgtgga actgcggcga 30
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)
 15
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer AR5
 20
 <400> 5
 cgcatcaagc tcaagatcga acccggctgg 30
 25
 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 30
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 AR_EX2Bgl
 35
 <400> 6
 gaattcgtaa gatcttacga accgatccac g 31
 40
 <210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 45
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 AR_EX1Nde
 50
 <400> 7
 caaggagcac atatgaaact cagcgggtgtg g 31

Patentansprüche

1. N-Acetylaminosäureracemase aus Amycolatopsis orientalis subspecies lurida. 55
2. Gene codierend für die Racemase gemäß Anspruch 1.
3. Plasmid aufweisend die Gene nach Anspruch 2.
4. Vektor aufweisend die Gene nach Anspruch 2.
5. Mikroorganismus aufweisend die Gene nach Anspruch 2.
6. Primer für ein Gen nach Anspruch 2.
7. Sonde für ein Gen nach Anspruch 2.
8. Verwendung der Racemase nach Anspruch 1 in einem Prozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten. 60
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man den Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor durchführt. 65

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1:

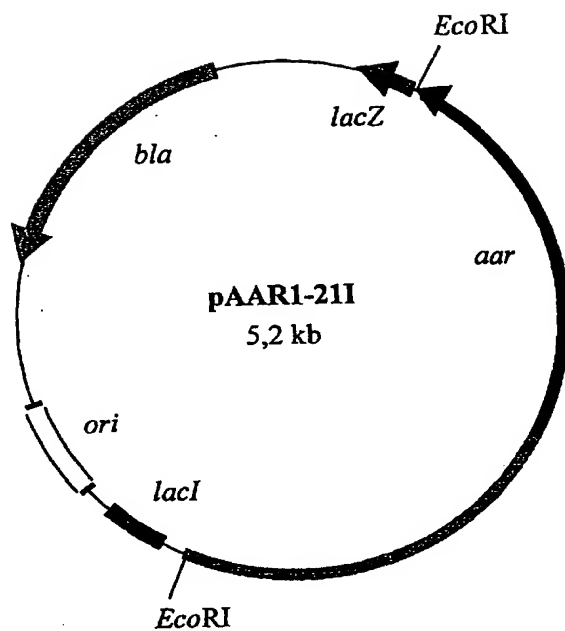


Fig. 2:

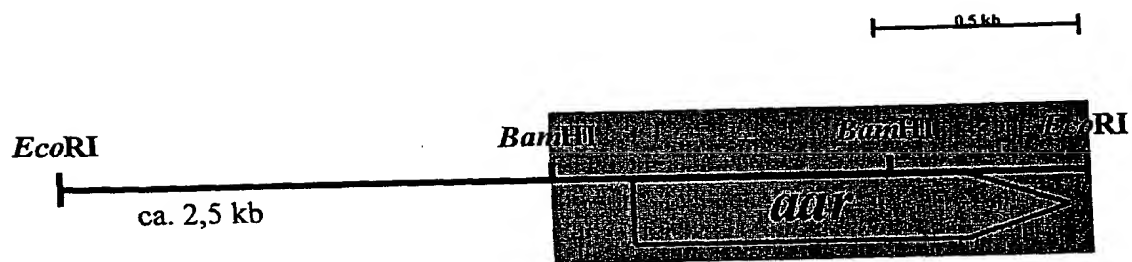


Fig. 3:

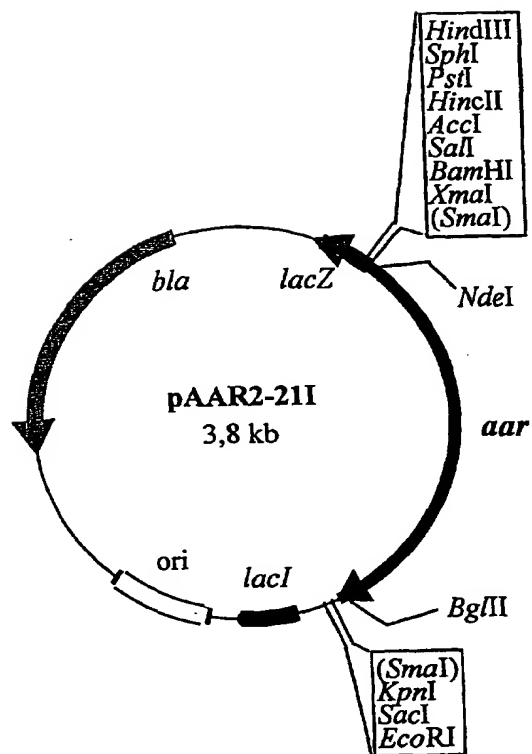


Fig. 4:

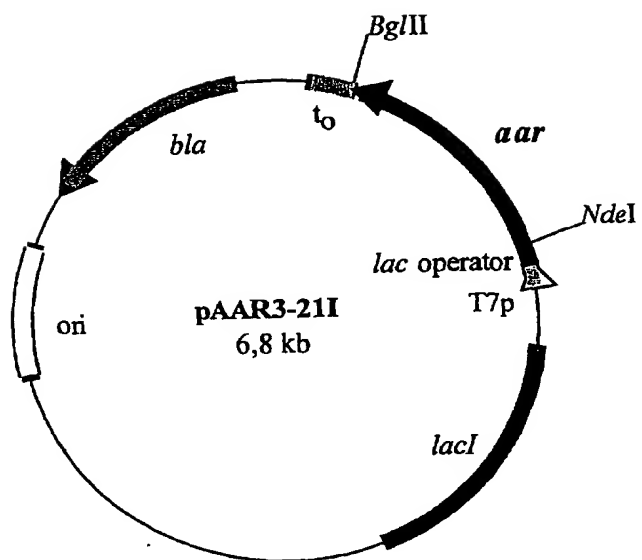


Fig. 5:

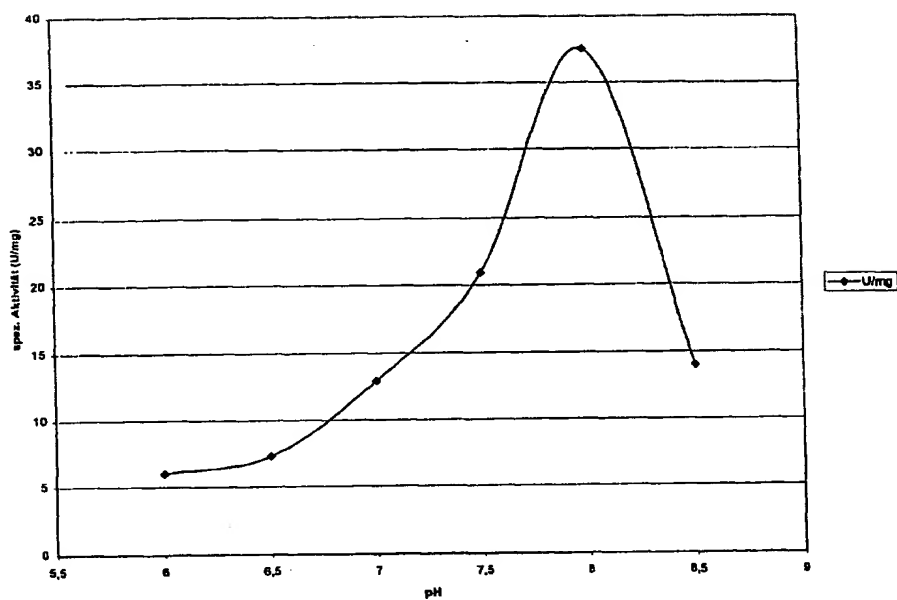


Fig. 6:

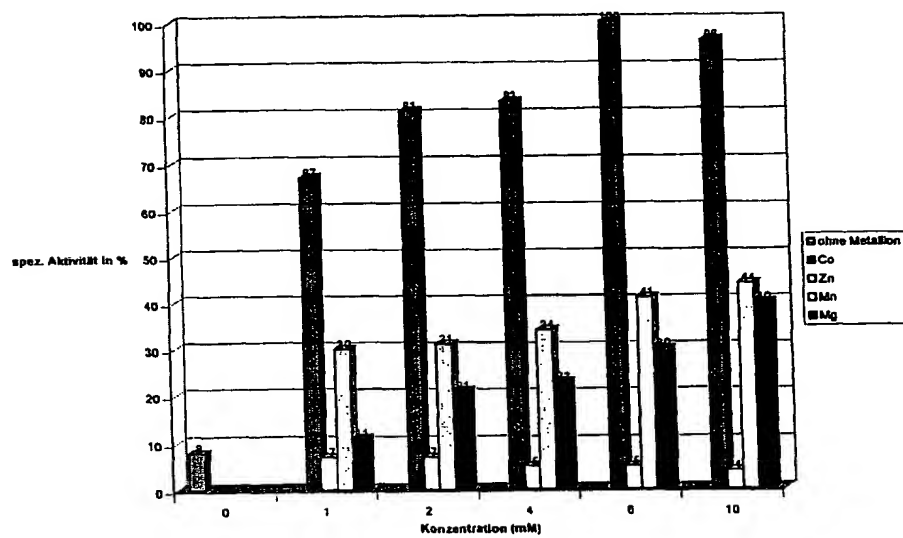


Fig. 7:

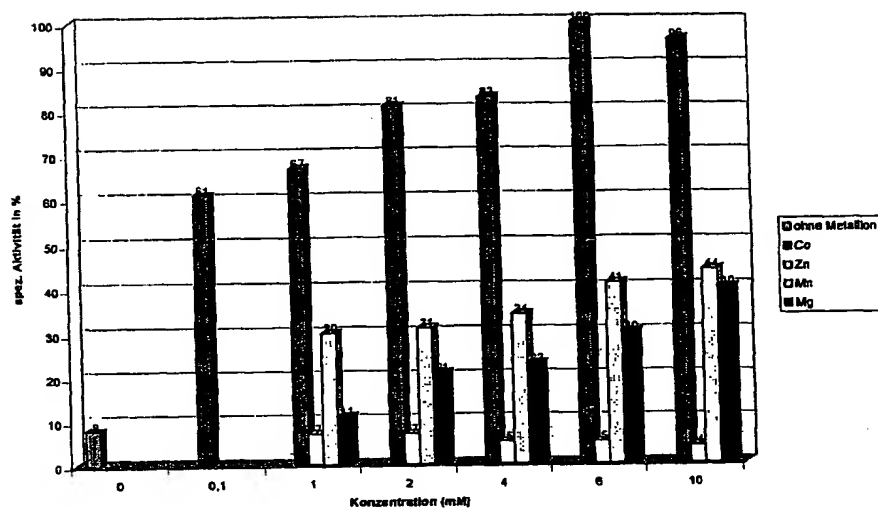


Fig. 8:

